



1/29/98

129 Screening "α-STNFR" Hybridomas Against Native STNFR

The previous screening of the hybridomas was against denatured STNFR (pg. 150 Book #3). In that assay, all the hybridoma supts. exhibited a positive signal. Ultimately, however, we want an antibody which recognizes the native protein. Therefore, we will now screen the hybridomas against captured, native STNFR from 9B supt.

Procedure

- 1) Coat 96-well plate w/ 2μg/ml goat α hSTNFR Ab in 0.1M NaHCO₃/well. - Block in 2% BSA/PBS
- 2) Add 9B (UG37+ pMTneo/hSTNFR) supt - 50μl/well
- 3) Add 50μl of hybridoma supt
- 4) Detect hybridoma Ab with goat α mouse-alkaline phosphatase Ab at 2μg/ml.
- 5) Add 50μl of pNPP substrate. Stop reaction w/ 50μl 5% EDTA.

(+) Control = Immune serum from mouse immunized w/ denatured STNFR to make hybridomas.

(-) Control = SP2/0 supt. (Raw Abs = 0.250)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.020	0.050	0.174	0.577	0.043	0.195	0.147	0.140	0.145	0.301	0.242	0.130
2	0.172	0.190	0.244	0.152	0.158	0.143	0.113	0.153	0.205	0.225	0.243	0.266
3	0.162	0.162	0.764	0.276	0.112	0.102	0.118	0.072	0.075	0.283	0.288	0.287
4	0.248	0.178	0.109	0.128	0.109	0.152	0.211	0.178	0.194	0.270	0.247	0.168
5	0.146	0.115	0.218	0.078	0.087	0.151	0.064	0.087	0.161	0.046	0.056	0.277
6	0.240	0.151	0.189	0.157	0.153	0.147	0.082	0.144	0.293	0.226	0.223	0.251
7	0.170	0.058	0.038	0.065	0.083	0.090	0.077	0.084	0.173	0.114	0.101	0.430+
8	0.243	0.210	0.217	0.114	0.157	0.021	0.028	0.028	0.044	0.018	0.010	0.000+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.179	0.407	5612	0.044	0.047	0.090	0.093	0.134	0.114	0.148	0.114	0.117
2	1812 B	0.532	0.494	5412	0.154	0.169	0.153	0.173	0.333	0.066	0.190	0.069
3	2612 C	0.388	0.493	0.4	0.154	0.211	0.177	0.186	0.283	0.169	0.084	0.078
4	2812 D	0.380	0.370	0.4	0.153	0.206	0.181	0.160	0.118	0.144	0.179	0.062
5	3412 E	0.407	0.270	0.4	0.153	0.049	0.184	0.170	0.179	0.175	0.084	0.084
6	3412 F	0.274	0.269	0.4	0.118	0.126	0.145	0.134	0.155	0.043	0.074	0.147
7	4412 G	0.477	0.374	0.4	0.084	0.073	0.087	0.141	0.161	0.166	0.085	0.142
8	4412 H	0.318	0.371	0.4	0.181	0.181	0.133	0.212	0.123	0.124	0.144	0.183

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1612 A	0.379	0.407	5612	0.044	0.047	0.090	0.093	0.134	0.114	0.148	0.114
2	1812 B	0.532	0.494	5412	0.154	0.169	0.153	0.173	0.333	0.066	0.190	0.069
3	2612 C	0.388	0.493	0.4	0.154	0.211	0.177	0.186	0.283	0.169	0.084	0.078
4	2812 D	0.380	0.370	0.4	0.153	0.206	0.181	0.160	0.118	0.144	0.179	0.062
5	3412 E	0.407	0.270	0.4	0.153	0.049	0.184	0.170	0.179	0.175	0.084	0.084
6	3412 F	0.274	0.269	0.4	0.118	0.126	0.145	0.134	0.155	0.043	0.074	0.147
7	4412 G	0.477	0.374	0.4	0.084	0.073	0.087	0.141	0.161	0.166	0.085	0.142
8	4412 H	0.318	0.371	0.4	0.181	0.181	0.133	0.212	0.123	0.124	0.144	0.183

Take all hybridomas above ≥ 0.3 Abs. units as positives to screen in TNF neutralization assay. Rescreen remaining.

Note: The only one that is positive on the "extra plate" is 1H12 - the report above does not have the background subtracted out. See the plate outline on the reverse for the list of the positives.

3 = 23MS

20.0355241

- 43